动 物 学 研 究 1999, Feb. 20 (1): 41～45 CN 53－1040/Q ISSN 0254－5853
Zoological Research

真菌多糖对中国对虾血清及淋巴细胞免疫活性的影响*

江晓路 刘树青 牟海津 王慧谧 管华诗
（青岛海洋大学水产学院 青岛 266003）

摘 要 选用从北虫草（*Cordyceps militaris*）中提取的真菌多糖作为免疫增强剂，测定真菌多糖对中国对虾（*Penaeus chinensis*）血清及淋巴器官中淋巴细胞的免疫活性的影响。经体腔内注射真菌多糖后，检测淋巴细胞的吞噬率和吞噬指数，以及对血清免疫活性的影响。实验结果表明：注射多糖 48 h 后，中国对虾淋巴细胞的吞噬率提高 11.4%、吞噬指数提高 39.7%。血清的溶血能力、溶菌能力与对照组相比有明显提高，一直维持到 96 h 仍具较高水平。对虾血清的凝集红细胞活性也有所增加。该真菌多糖对中国对虾的非特异性免疫功能具有明显的增强作用。

关键词 真菌多糖，中国对虾，血清，淋巴细胞
中图分类号 Q959.223.63

中国对虾（*Penaeus chinensis*）的养殖在我国养殖业中占有重要的地位。近几年的大规模养殖和养殖密度的盲目增加使对虾的养殖环境受到严重的污染，各种对虾致病因子不断引起暴发性传染病，造成对虾的减产或绝收。研究和提高对虾的自身抗病能力对防治对虾的病害具有重要意义。这方面的研究主要有：口服免疫药物对中国对虾血清中一些免疫相关酶类的影响，证明某些与免疫相关的酶类可以因免疫药物的影响而使活性增加（王雷等，1995）；通过中药制剂也可调节中国对虾血清的免疫活性，表现在溶菌活力和凝集活力的提高（罗日祥，1997）；溶菌酶是动物体液及血液中的重要的非特异性免疫因子，也是中国对虾免疫防御系统的重要组成部分；溶血素在脊椎动物中普遍存在，可溶解异种动物红细胞，而有关甲壳动物的溶血素，曾对其性质有所报道（Armstrong 等，1992；高健等，1992），证明其在甲壳动物的免疫防御中起重要的作用，并可能与体液的杀菌活性有关（王雷等，1992）；甲壳动物中的凝集素则研究的较多，它作为一种非特异性的识别因子，可以对多种脊椎动物红细胞、细菌和其他颗粒进行凝集（陈皓文等，1995）。本实验测定了中国对虾在注射真菌多糖后 96 h 内，淋巴细胞的吞噬活性、血清的溶菌溶血活性及凝集红细胞性能。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 实验用虾 体长 10～12 cm 的养殖中国对虾（*Penaeus chinensis*），购于青岛红岛对虾养殖场。

1.1.2 鸡红细胞 无菌采集鸡红细胞，置于 Alsever's 液中，4℃冰箱保存备用。

1.1.3 实验用菌种 白色念珠菌（*Candida albicans*）在麦芽汁斜面上活化后备用，溶壁微球菌（*Micrococcus lysodeikticus*）在肉汤培养基上活化备用。

1.1.4 真菌多糖由青岛海洋大学食品微生物实验室提供，为虫草（*C. militaris*）发酵产物的胞内多糖，发酵菌丝体经水提后，用 3 倍乙醇沉淀，Sevage 法去蛋白，透析后得到的粗多糖、为含甘露糖、半乳糖和葡萄糖的杂多糖，用生理盐水配制成 1%的溶液，灭菌后备用。

* 国家攀登计划 B “海养生物优抗研究” 资助项目
本文 1998－03－31 收到，1998－07－07 修回

1.2 方 法

1.2.1 实验分组及预处理 选择健康、大小均匀的中国对虾，设实验组和对照组各50尾虾，分养于0.5 m^3 的养殖池中，水温25℃，24 h通气，每天换水1次。实验组每尾虾从第3泳足处由腹面注入0.2 mL真菌多糖，对照组按同样方法注射等量的无菌生理盐水。

注射多糖后每隔24 h用无菌兰芯注射器，从对虾围心腔采血，置于无菌磨口离心管中。−28℃冰箱保存备用。

1.2.2 淋巴细胞吞噬作用的测定（朱忠勇，1997） 用无菌生理盐水洗下经活化的白色念珠菌斜面，煮沸灭活后制成 1.2×10^7 个/mL的菌悬液。取注射多糖后48 h的中国对虾进行实验，实验组和对照组各取10尾，于对虾的第3泳足处注射0.1 mL菌悬液，1 h后，整体取下对虾的淋巴器官，在载玻片上用1滴生理盐水洗涤淋巴细胞后推片，用Giemsa液染色5 min，找涂片均匀的视野，每次检测100个淋巴细胞，计算吞噬率和吞噬指数。

1.2.3 血清溶菌酶活力的测定 将液体培养的溶壁微球菌用无菌生理盐水离心洗涤数次后，用0.1 mol/L pH 6.4的磷酸缓冲液配制成一定浓度的作用底物（570 nm处的光吸收值约为0.3），按朱忠勇（1997）的方法进行测定。血清溶菌酶活力用 U/mL = $(A_0 - A)/A$（A_0 为保温前的光吸收值，A 为保温后的光吸收值）。

1.2.4 血清溶血素的测定（陈勤，1996） Alsever's液保存的鸡红细胞用生理盐水离心洗涤数次后，配制成3%的红细胞悬液，用于测定对虾血清的溶血作用。取2.5 mL红细胞悬液加0.1 mL对虾血清（对照组用0.1 mL的生理盐水代替血清），25℃保温1 h后，1 000 r/min离心2 min，于540 nm处测光吸收值。溶血素含量（hemolysin concentration）表示为：所测OD值/稀释倍数。

1.2.5 血清凝集红细胞活性的测定（罗日祥，1997） 采用试管凝集法进行测定。鸡红细胞离心洗涤后制成5%的生理盐水悬液，与不同稀释度的对虾血清进行混合，于25℃保温40 min，检测血清的红细胞凝集活性。

2 结 果

2.1 对虾淋巴细胞吞噬功能的测定

真菌多糖对中国对虾淋巴细胞吞噬功能的影响的测定结果见表1，实验结果用 $\overline{X}\pm SD$ 表示，$n=10$，显著性用 t 检验。

中国对虾淋巴细胞的吞噬作用是在注射真菌多糖48 h后测得的，实验发现其吞噬活力有明显的提高，吞噬率提高了11.4%，吞噬指数由156增至218。

2.2 对虾血清溶菌酶活力的测定

溶菌酶是动物机体重要的体液性免疫因素。中国对虾的血清中含有溶菌酶，可水解革兰氏阳性菌从而降低菌悬液的浓度。本实验测定了真菌多糖对中国对虾血清中溶菌酶活性的影响，结果如表2。

结果表明中国对虾注射真菌多糖后，溶菌酶活力明显增强；注射48 h后活力达到最高，为0.65 U/mL；72 h时下降到0.38 U/mL，但仍高于对照组并维持到96 h。

2.3 对虾血清的溶血活性的测定

溶血素在无脊椎动物中作为一种非特异性的免疫因子，具有重要的防御机能。我们在中国对虾的血清中也发现溶血素，能够使鸡红细胞发生溶解，而且其溶血性因真菌多糖的影响而增高（表3）。

结果表明：中国对虾在注射真菌多糖后，血清的溶血作用明显增强，注射24 h时的溶血活性最高，由对照组的0.675增至1.600，到96 h时溶血活性仍比对照组高出一倍多。

表1 真菌多糖对中国对虾淋巴细胞的吞噬率和吞噬指数的影响

Table 1 Effects of fungus polysaccharose on the phagocytic rate and index of lymphocyte of *Penaeus chinensis*

组 别 (group)	统计细胞数 (number)	吞噬率/% (phagocytic rate)	吞噬指数 (phagocytic index)
真菌多糖（fungus polysaccharide）	100×10	40.22±3.18*	218
对照（生理盐水）[control (physiological saline)]	100×10	28.83±2.66	156

* 表示与对照组相比较 $P<0.01$（$P<0.01$, vs control）。

表 2　真菌多糖对中国对虾血清溶菌酶活力的影响

Table 2　Effects of fungus polysaccharose on the lysozyme of *Penaeus chinensis*

组　别 (group)	注射剂量/mL (dose)	血清的溶菌酶活力/U·mL^{-1} (lysozyme activity)			
		24 h	48 h	72 h	96 h
真菌多糖 (fungus polysaccharide)	0.2	0.47	0.65	0.38	0.37
对照（生理盐水）[control (physiological saline)]	0.2	0.13	0.20	0.23	0.20

表 3　真菌多糖对中国对虾血清溶血活性的影响

Table 3　Effects of fungus polysaccharose on hemolytic activity of *Penaeus chinensis*

组　别 (group)	注射剂量/mL (dose)	血清的溶血素含量 (hemolysin concentration)				
		0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
真菌多糖 (fungus polysaccharide)	0.2	0.725	1.600	1.500	1.200	1.185
对照（生理盐水）[control (physiological saline)]	0.2	0.650	0.675	0.350	0.550	0.500

2.4　对虾血清对鸡红细胞凝集活性的测定

凝集作用是无脊椎动物的免疫防御的重要方面。本研究建立了测定中国对虾血清凝集素的方法，并证明了真菌多糖对凝集活性有一定的增强作用，结果如表4。

注射真菌多糖后，中国对虾血清的凝集活性在48 h达到最高，形成明显凝集颗粒的血清稀释度为1:100。在96 h时，实验组的凝集活性仍高于对照组。

表 4　真菌多糖对中国对虾血清凝集素活性的影响

Table 4　Effects of fungus polysaccharose on hemagglutinating activity of *Penaeus chinensis*

组　别 (group)	时间/h (time)	血清不同稀释度的凝集活性 (hemagglutinating activity)				
		1:70	1:80	1:90	1:100	1:110
真菌多糖 (fungus polysaccharide)	24	++	++	+	−	−
	48	++	++	++	+	±
	72	++	++	+	±	−
	96	++	++	+	±	−
对　照（生理盐水）[control (physiological saline)]	24	++	++	+	−	−
	48	++	++	+	−	−
	72	++	+	±	−	−
	96	++	+	±	−	−

++. 凝集成块状于管底 (agglutinated lumps formed in the bottom);
+. 转动试管可见凝集颗粒 (agglutinated grains could be found turning the tube);
±. 沉积面周围有凝集颗粒，中间为沉降细胞，振荡后凝集不明显 (agglut-inated grains were around the deposited cells, and agglutination disappeared after shaking);
−. 无凝集，沉积面边缘光滑 (no agglutination was found, and the deposited edge was smooth)。

3　讨　论

3.1　免疫多糖作为一种非特异性免疫促进剂，能够增强机体的细胞免疫和体液免疫功能（李光友，1995）。利用免疫多糖作为免疫添加剂，在水产养殖业中逐渐得到应用和开发，用于增强养殖生物的体质和抗病能力。王雷等（1995）曾利用富含多糖、生物碱及氨基酸等成分的免疫药物制成饵料，

在中国对虾养殖中进行应用，发现中国对虾的发病率和死亡率有很大程度地降低，虾体内的抗菌、溶菌活力和酚氧化酶等指标均有提高。本次实验采用的虫草多糖是一种真菌多糖，经反复实验验证，该多糖能够提高高等动物机体的特异性和非特异性免疫功能，并具有延缓衰老、抑制肿瘤等特殊功效(江晓路等，1998)。本项研究旨在增强对虾自身抗病力的生物学研究，对对虾自身的免疫防御因子进行检测，摸索出一套适用于对虾体质检测的方法，并最终选择出能够有效增强对虾免疫力的药物，在对虾养殖业中得到应用。

3.2 本实验以北虫草中提取到的真菌多糖制品配成1%的溶液后，直接注射到中国对虾体腔的。实验过程中，在小型养殖池中通气换水，因素影响期间不喂食，对虾的自然死亡率对照组为5%，实验组为2%，说明这种给药方式及剂量对对虾生存无不利影响。实验组显示出较明显的抗性，这与我们所做的对免疫作用的提高具有协同性。真菌多糖对中国对虾的免疫增强作用的实验我们已经进行了3年，证明这种多糖在中国对虾的免疫功能方面具有较大程度的增强作用。另外，我们也进行了不同剂量、不同给药方式的实验研究，测定了这种真菌多糖对中国对虾的免疫功能及一些相关酶类活性的影响，方法成熟、结果重复性好，有关结果另文报道。

3.3 中国对虾的淋巴器官是重要的过滤器官，进入虾体内的异物随血流很快被滤入淋巴器官，并且被淋巴器官内的吞噬细胞吞噬掉。但是对于不同的异物，如细菌、氯化硝基四氮唑兰、白色念珠菌等，吞噬率则有差异，以白色念珠菌的效果最好。用白色念珠菌作为吞噬物容易观察，计数结果重复性好，而用葡萄球菌作吞噬物时，由于葡萄球菌具有分裂不分离的特点，所测吞噬指数会有一定的误差。

3.4 溶血素作为一种免疫因子已在多种无脊椎动物中发现，有人认为甲壳动物的溶血素可能与体液发热杀菌活性及酚氧化酶原的激活有关（王雷等，1992)。

3.5 甲壳动物的凝集素在免疫反应中作为识别因子可与外来异物结合或覆盖在异物表面，使其失去进一步感染寄主的能力，同时具有调理素的作用，能促进吞噬细胞的识别和吞噬作用（陈皓文等，1995)，这对于免疫系统不发达的甲壳动物更有意义。实验结果表明真菌多糖可增加中国对虾血清的凝集活性，同时也发现患病对虾的血清凝集活性明显低于正常对虾。因此，中国对虾的凝集素活性可以作为检测对虾健康状况和血清免疫活性的指标之一。

参考文献

王 雷，李光友，1992. 甲壳动物的体液免疫研究进展. 海洋科学，3：18～19.（Wang Lei, Li Guang-you, 1992. Progress of humoral immunity of crustecea. *Marine Science*, 3：18－19.）

王 雷，李光友，毛远兴，1995. 口服免疫药物后中国对虾某些淋巴因子的测定及方法研究. 海洋与湖沼，26(1)：34～41. [Wang Lei, Li Guang-you, Mao Yuan-xing, 1995. Study of some lymphoid factors of *Penaeus chinensis* taking orally immue drug. *Ocean and Limnology*, 26(1)：34－41.]

江晓路，葛蓓蕾，1998. 北虫草菌Y3胞内与胞外多糖的免疫药理研究. 青岛海洋大学学报，28(2)：192～198. [Jiang Xiao-lu, Ge Bei-lei, 1998. Study of immunopharmacology of intracellular and extracellular polysaccharide of *Cordyceps militaris* Y3. *Journal of Qingdao Ocean University*, 28(2)：192－198.]

朱忠勇，1997. 实用医学检验学. 北京：人民军医出版社，795～805.（Zhu Zhong-yong, 1997. Practical medical examination. Beijing: People's Military Medical Press. 795－805.）

李光友，1995. 中国对虾疾病与免疫机制. 海洋科学，4：1～3.（Li Guang-you, 1995. Diseases and immune mechanism of *Penaeus chinensis*. *Marine Science*, 4：1－3.）

陈皓文，孙丕喜，宋庆云，1995. 外源凝集素——水产动物御敌的有利兵器. 黄渤海海洋，13(3)：61～70. [Chen Hao-wen, Sun Pi-xi, Song Qing-yun, 1995. Lectins available weapon of aquatic animal. *Yellow Sea and Bohai Sea*, 13(3)：61－70.]

陈 勤，1996. 抗衰老研究实验方法. 北京：中国医药科技出版社. 344～348.（Chen Qin, 1996. Experimental methods of antisenescence. Beijing: Medical Science Press of China. 344－348.）

罗日祥，1997. 中药制剂对中国对虾免疫活性物的诱导作用. 海洋与湖沼，28(6)：573～577. [Luo Ri-xiang, 1997. Induction of traditional Chinese medicine on immune activities of *Penaeus chinensis*. *Ocean and Limnology*, 28(6)：573－577.]

高 健，李跃华，1992. 甲壳类的体液免疫因子及其环境作用. 水产养殖，6：21～23.（Gao Jian, Li Yue-hua, 1992. Humoral immune factors of crustecea and environmental effects. *Aquatic Culture*, 6：21－23.）

Armstrong P B, Armstrong M T, Quigley J P, 1992. A hemolytic activity in the blood of the American horseshoe crab, *Limulus polyphemus* that resembles the mammalian complement system. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole*, 183(2)：378－379.

EFFECTS OF FUNGUS POLYSACCHAROSE ON IMMUNE ACTIVITIES OF SERUM AND LYMPHOCYTE OF *Penaeus chinensis*

JIANG Xiao-lu　LIU Shu-qing　MOU Hai-jin　WANG Hui-mi　GUAN Hua-shi
(*Fisheries College, Ocean University of Qingdao, Qingdao* 266003)

Abstract　Fungus polysaccharose abstracted from *Cordyceps militaris* was used as immunopotentiator, and was tested the effects on immune activities of the serum and lymphocyte of *Penaeus chinensis*. After the prawns' were injected intraperitoneally by fungus polysaccharose, the phagocytic rate and index of lymphocyte, and immune activities of serum were detected. The results showed as follows: When the prawn had been injected for 48 h, the phagocytic rate of lymphocyte increased by 11.4%, the phagocytic index increased by 39.7%. The hemolytic ability and bacteriolytic ability of serum improved evidently over the control group, preserved at a high level until 96 h after injection. Hemagglutinating activities of serum of *P. chinensis* enhanced too. The polysaccharose could strengthen the nonspecific immunization function of *P. chinensis* distinctly.

Key words　Fungus polysaccharose, *Penaeus chinensis*, Serum, Lymphocyte

成果简介

"峨眉山藏猕猴行为生态学研究"获中国科学院自然科学一等奖

藏猕猴（*Macaca thibetana*）是我国特有高等灵长类动物。峨眉山藏猕猴种群具有生境垂直变异大、社会环境丰富、个体易于识别等特点。在中国国家自然科学基金、美国"Wenner-Gren 人类学研究基金"、美国"全国地理学会"的资助下，昆明动物研究所赵其昆研究员等以峨眉山藏猕猴为研究对象，在 12 年艰苦的野外工作基础上，采用现代行为生态学研究方法，注重系统取样、定量分析和年周期现象跟踪等，积累了大量基本生物学资料，形成和验证了一批重要的行为生态学理论或假设。其核心内容包括：高度季节性环境中，繁殖时间－能量预算的优化途径；能源环境参与规范社会行为；交配模式的即时社会环境制约；雄性交配竞争性质和近亲繁殖避免机制；群间食物竞争和性吸引在社区组织中的抗衡和性选择在群间遭遇时的表达；两性社会关系中的政治谋略等。其中"生态参数规范社会行为"、"即时社会环境制约模式"等行为学核心问题尤为重要，丰富了人们对动物行为适应机制的认识，强化了人和动物行为进化的联系，为人类认识自己提供了有价值的背景信息。其研究结果主要发表在国际较有影响的刊物上，引起了国际灵长类行为学界的广泛关注。主持人赵其昆应邀荣任国际灵长类学会会刊《Int. J. Primatol.》编委会编委。研究成果荣获中国科学院 1998 年自然科学一等奖。

杨若云
（中国科学院昆明动物研究所计财处　650223）